

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/007459

International filing date: 19 April 2005 (19.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-122898  
Filing date: 19 April 2004 (19.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 02 June 2005 (02.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 4月19日

出願番号  
Application Number: 特願2004-122898

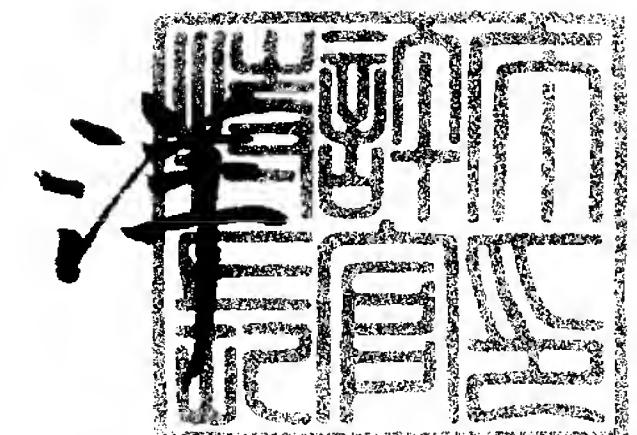
パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号  
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is  
JP 2004-122898

出願人  
Applicant(s): デンカ生研株式会社  
三洋化成工業株式会社

2005年 5月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 3373004419  
【提出日】 平成16年 4月19日  
【あて先】 特許庁長官 今井 康夫 殿  
【国際特許分類】 C12N 5/10  
【発明者】  
【住所又は居所】 新潟県五泉市南本町1-2-2 デンカ生研株式会社内  
【氏名】 甲斐 光  
【発明者】  
【住所又は居所】 新潟県五泉市南本町1-2-2 デンカ生研株式会社内  
【氏名】 樋 正幸  
【発明者】  
【住所又は居所】 京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内  
【氏名】 黒川 祐人  
【特許出願人】  
【識別番号】 591125371  
【氏名又は名称】 デンカ生研株式会社  
【特許出願人】  
【識別番号】 000002288  
【氏名又は名称】 三洋化成工業株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100080089  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 牛木 譲  
【電話番号】 03-3500-1720  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100119312  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 栄松  
【電話番号】 03-3500-1720  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 010870  
【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

接着性細胞を動物由来成分を含有しない支持体に接着させ、前記支持体に接着させた接着性細胞を動物由来成分を含有しない培地で培養し、前記培地で培養した接着性細胞を動物由来成分を含有しない細胞分散剤を用いて継代培養することを特徴とする接着性細胞の培養方法。

【請求項 2】

前記支持体が、マイクロキャリアーであることを特徴とする請求項 1 記載の接着性細胞の培養方法。

【請求項 3】

前記マイクロキャリアーに組換え接着因子を被覆したことを特徴とする請求項 2 記載の接着性細胞の培養方法。

【請求項 4】

前記細胞分散剤が、組換え型酵素であることを特徴とする請求項 1 記載の接着性細胞の培養方法。

【請求項 5】

前記接着性細胞が、恒温動物由来細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の接着性細胞の培養方法。

【請求項 6】

接着性細胞を動物由来成分を含有しない支持体に接着させ、前記支持体に接着させた接着性細胞を動物由来成分を含有しない培地で培養し、前記培地で培養した接着性細胞を動物由来成分を含有しない細胞分散剤を用いて継代培養し、前記接着性細胞の培養細胞にウイルスを接種、回収することを特徴とするウイルスの生産方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】接着性細胞の培養方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、接着性細胞の培養方法に関し、さらに詳しくはその細胞培養によるウイルスの工業的生産方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、BSE（ウシ海綿状脳症）感染やトリインフルエンザウイルス感染等の人獣共通感染症に対する危険性が懸念され始めている。そして、主に動物に由来する原料又は材料を用いた製品（例えは、ワクチン、血液製剤、細胞培養／遺伝子組換え製剤、細胞組織医療品など）には、感染因子が混入する危険性が高く、未知の感染性因子を含有している可能性が否定できない他、感染因子の不活化処理等に限界があるなどの問題があった。このような問題に関する対策として、平成15年度の薬事法の改正により「生物由来製品」という枠組みが新たに設けられるなど法的な安全性対策が強化されており、動物由来成分を全く含まない医薬製品の開発が望まれていた。

【0003】

一方、ワクチンやモノクローナル抗体などの生物学的製剤の工業的規模の製造方法としては、品質が一定した大量のワクチンやモノクローナル抗体が得られることから細胞培養による製造方法が有用とされている。これらの製造に用いられる動物細胞は接着性のものが多く、この接着性細胞は固体表面に接着して増殖するものである。そして、接着性細胞を大量に培養することを目的として、例えはマイクロキャリアーなどの支持体を用いた培養方法が知られている。

【0004】

接着性細胞を用いたウイルスの工業的製造方法として、例えは特許文献1にはVero細胞と、cytodex1（登録商標）のマイクロキャリアーとを用いてVero細胞を増殖させ、その後培地を5g/L以下の動物由来のタンパク質を含有する培地に換え、日本脳炎に対するウイルスを製造する方法が開示されている。また、非特許文献1には、Vero細胞と、cytodex1（登録商標）のマイクロキャリアーと、動物由来の血清含有培地とを用いて細胞を増殖させ、その後不活化ポリオウイルスを製造する方法が開示されている。さらに、特許文献2には、Vero細胞と、cytodex1（登録商標）のマイクロキャリアーと、血清含有培地とを用いて細胞を増殖させ、その後無血清培地を用いて日本脳炎ウイルスを製造する方法が開示されている。しかしながら、動物由来の血清を含有する培地の使用により上述のような未知の感染因子を含有している可能性があるなどの問題があった。

【0005】

このような背景から、各培地メーカーより動物由来成分を含有しない無血清培地が市販されるなど血清を必要としない培養条件を得るための多くの試みがなされているものの、無血清培地と、接着性細胞の培養の支持体として担体表面に適正な電荷を帯びさせて細胞を付着させるマイクロキャリアーとを使用した培養方法では、マイクロキャリアーへの付着率が低下し細胞を効率よく大量に培養することが困難であるといった問題があった。そのため、従来このような培養条件下では、例えは非特許文献2に記載されているようなブタ変性コラーゲンが被覆されたマイクロキャリアーなどの動物由来成分を含有するものが用いられていた。

【0006】

また、細胞の接着・増殖性が高く、無血清培地を用いても血清含有培地と同等以上の接触・増殖性を与える動物細胞培養用ビーズが特許文献3に開示されている。しかしながら、前記特許文献3には、細胞培養において無血清条件下で細胞の効率的な培養が可能なことが示されているものの、ウイルスの培養条件については開示されていない。

【0007】

また、特許文献4には、Vero細胞のような脊椎動物細胞培養を得、（血清および非血清タンパクを含まない）無タンパク培地中のみで細胞を増殖させ、この培養にウイルスを感染させ、ウイルスを感染させた細胞培養をインキュベーションして、培地中でウイルスを増殖させ、ウイルス含有培地を生産する工程を含むウイルスの生産方法が開示され、さらに、ウイルスの活性を増強する物質として原核生物供給源由来のプロテアーゼを用いることが開示されている。前記特許文献4には、この方法によれば得られるウイルスがヒト供給源、または動物供給源由来のあらゆる夾雜化合物、または病原性物質であるタンパクを含まないと記載されているが、実施例には、ウイルスの活性を増強する物質として動物由来成分のトリプシンが使用されている。

#### 【0008】

さらに、特許文献5には、天然由来のタンパク質を使用せず細胞接着性の高い細胞接着支持体を用いたウイルス感染昆虫細胞の生産方法が開示されている。この生産方法は、細胞接着性人工ペプチド及び／又は細胞接着補助人工ペプチドを用いて、変温動物由来細胞及び基材を接着させ、この細胞接着基材を用いて細胞培養することを特徴とするウイルス感染昆虫細胞の生産方法である。前記特許文献5には、基材に天然由来のタンパク質を用いないためにヒト感染性のウイルス等の感染物質を含有する危険性がなく安全性が高いと記載されているものの、ウイルス感染昆虫細胞を培養する培地に動物由来の血清を含有する培地が使用されている。

#### 【0009】

一方、上記の特許文献2および非特許文献2の細胞の継代には細胞分散剤として、動物由来のプロテアーゼ（例えは、ブタ由来トリプシンなど）が使用されている。

【特許文献1】特表平11-510151号公報

【特許文献2】特開2000-83657号公報

【特許文献3】特開2003-189848号公報

【特許文献4】特許3158157号公報

【特許文献5】特開2003-210166号公報

【非特許文献1】Montangnon B. J., Fanget B., Nicolas A. J. Develop. Biol. Standard 47, 55-56 (1981).

【非特許文献2】Otfried Kisrner et al. "Development of a Novel Mammalian Cell (Vero) Derived influenza Vaccine" Poster Presented at: Options for Control of Influenza V, Okinawa, Japan, October 7-11, 2003

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

そこで、本発明は、接着性細胞の培養とその細胞培養によるウイルスの工業的生産までの全工程において、動物由来成分を全く含有しない培養系での安全で且つ大量に培養可能な接着性細胞の培養方法およびウイルスの生産方法を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

上記課題に鑑みて鋭意検討した結果、動物由来成分を含有しない培養材料を用いることによって、安全で且つ品質が一定した接着性細胞が大量に培養できる可能性があることを見出し、本発明に想到した。

#### 【0012】

本発明の請求項1記載の接着性細胞の培養方法は、接着性細胞を動物由来成分を含有しない支持体に接着させ、前記支持体に接着させた接着性細胞を動物由来成分を含有しない培地で培養し、前記培地で培養した接着性細胞を動物由来成分を含有しない細胞分散剤を用いて継代培養することを特徴とする。

#### 【0013】

本発明の請求項2記載の接着性細胞の培養方法は、請求項1において、前記支持体が、マイクロキャリアーであることを特徴とする。

## 【0014】

本発明の請求項3記載の接着性細胞の培養方法は、請求項2において、前記マイクロキャリアに組換え接着因子を被覆したことを特徴とする。

## 【0015】

本発明の請求項4記載の接着性細胞の培養方法は、請求項1において、前記細胞分散剤が、組換え型酵素であることを特徴とする。

## 【0016】

本発明の請求項5記載の接着性細胞の培養方法は、請求項1において、前記接着性細胞が、恒温動物由来細胞であることを特徴とする。

## 【0017】

本発明の請求項6記載のウイルスの生産方法は、接着性細胞を動物由来成分を含有しない支持体に接着させ、前記支持体に接着させた接着性細胞を動物由来成分を含有しない培地で培養し、前記培地で培養した接着性細胞を動物由来成分を含有しない細胞分散剤を用いて継代培養し、前記接着性細胞の培養細胞にウイルスを接種、回収することを特徴とする。

## 【発明の効果】

### 【0018】

本発明の請求項1記載の接着性細胞の培養方法によれば、動物由来成分を全く含まないので、安全で且つ品質が一定した接着性細胞を大量に培養することができる。

### 【0019】

本発明の請求項2記載の接着性細胞の培養方法によれば、接着性細胞を大量に培養することができる。

### 【0020】

本発明の請求項3記載の接着性細胞の培養方法によれば、動物由来成分を全く含まないので、安全で且つ品質が一定した接着性細胞を大量に培養することができる。

### 【0021】

本発明の請求項4記載の接着性細胞の培養方法によれば、動物由来成分を全く含まないので、安全で且つ品質が一定した接着性細胞を大量に培養することができる。

### 【0022】

本発明の請求項5記載の接着性細胞の培養方法によれば、培養材料として動物由来成分を全く含まないので、安全で且つ品質が一定した接着性細胞を大量に培養することができる。

### 【0023】

本発明の請求項6記載のウイルスの生産方法によれば、動物由来成分を全く含まないので、安全で且つ品質が一定したウイルスを大量に生産することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

### 【0024】

以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。

### 【0025】

本発明において「動物由来成分を含有しない」とは、恒温動物、特に哺乳類（例えは、ヒト、ウシ、ブタ、イヌ、ウサギ、ネコなど）、鳥類、魚類などの動物由来の成分を含有しないことを意味する。

### 【0026】

また、本発明において接着性細胞とは、固体表面に接着して増殖し、ウイルスを培養可能な細胞であれば特に限定されないが、好ましい接着性細胞は、恒温動物由来の接着性細胞である。恒温動物由来の接着性細胞としては、例えは、上皮細胞（Vero細胞、MDCK細胞、CHO細胞、HEK293細胞、COS細胞など）、腫瘍細胞（HeLa細胞、VACO細胞など）、内皮細胞（HUVVEC細胞、DBAE細胞など）、白血球（HT-T15細胞など）、線維芽細胞（WI38細胞、BHK21細胞、SFME細胞など）、筋肉細胞（HL1細胞、C2C12細胞など）、神経／内分泌腺細胞（ROC-1細

胞、IMR-32細胞など)などが挙げられる。

#### 【0027】

また、本発明で接着性細胞に接種されるウイルスとしては、例えば、ラビウイルス科、オルソミクソウイルス科、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科、ピコルナウイルス科、パラミクソウイルス科、トガウイルス科、ポックスウイルス科などが挙げられる。

#### 【0028】

さらに、本発明で使用した動物由来成分を含有しない培養材料(例えば、培地、細胞分散剤、接着性細胞を接着させるための支持体など)は、動物由来成分を含有していないため、外来性物質による汚染の可能性を最低限に抑えることができ、未知の感染性因子を含有していることがなく、さらに感染因子混入の危険性が低く、そのため感染因子を不活化させる処理を行う必要がないなどの利点を有する。以下、本発明の動物由来成分を含有しない培養材料について具体的に説明する。

#### 【0029】

接着性細胞の培養およびウイルス生産に用いる培地は、動物由来成分である血清やタンパク質などを含有しない培地であれば特に限定されず、例えば、VP-SFM(インビトロジエン社製)などが挙げられる。このVP-SFMは、Vero、COS-7、MDCK、BHK-21、HEp-2の細胞系の培養に適しており、特にウイルスの増殖と組換えタンパク質およびモノクローナル抗体の产生に適している。

#### 【0030】

接着性細胞を接着させるための支持体とは、接着性細胞が支持体表面に接着し増殖可能な支持体で、動物由来成分を含有せず且つ細胞接着性の高い支持体である。支持体の基材としては、例えばデキストラン、アクリル樹脂、ガラス、ポリエチレン、ポリスチレンなどの材質からなるビーズ状のマイクロキャリアーなどが挙げられ、このマイクロキャリアーにより大量に細胞やウイルスなどを培養することができる。また、支持体としては、ビーズ状の基材に例えは組換え接着因子を被覆したマイクロキャリアーなどが挙げられ、最も好ましい支持体としては、Arg-Gly-Asp配列を含み、シルクフィブロイン構造を有する遺伝子組換え大腸菌による合成タンパク質であるプロネクチン(三洋化成工業(株)の登録商標)を被覆したマイクロキャリアーが挙げられる。このプロネクチン(登録商標)は、従来の接着因子剤(フィブロネクチンなど)と比較して細胞接着・増殖活性に優れしており、無血清培養法において、密度の高い細胞培養を可能にすることができる。

#### 【0031】

細胞分散剤とは、継代培養の際に使用される動物由来成分を含有しない細胞分散剤であって、好ましくは、高純度の醜酵生成物である組換え型酵素などが挙げられる。この組換え型酵素は、微生物によって產生される動物トリプシンの代替物質として用いることができる。

#### 【0032】

本発明の接着性細胞の培養方法は、接着性細胞を動物由来成分を含有しない支持体に接着させ、前記支持体に接着させた接着性細胞を動物由来成分を含有しない培地で培養し、前記培地で培養した接着性細胞を動物由来成分を含有しない細胞分散剤を用いて継代培養する方法である。また、本発明のウイルスの生産方法は、接着性細胞を動物由来成分を含有しない支持体に接着させ、前記支持体に接着させた接着性細胞を動物由来成分を含有しない培地で培養し、前記培地で培養した接着性細胞を動物由来成分を含有しない細胞分散剤を用いて継代培養し、前記接着性細胞の培養細胞にウイルスを接種して、その後目的とするウイルスを大量に生産する方法である。

#### 【0033】

本発明の方法によれば、細胞培養およびウイルスの生産の全工程において、全く動物由来成分を含有しない培養材料を用いているため、安全で且つ品質が一定した接着性細胞が大量に培養できる。さらに、外来性物質による汚染の可能性を最低限に抑えることができ、さらに未知の感染性因子を含有していることがないため感染因子を不活化させる処理を行う必要がないなどの利点を有する。

## 【0034】

本発明は上記の記載内容に限定されるものではなく、本発明の要旨の範囲内において種々の変形実施が可能である。

## 【0035】

以下、本発明の実施例を添付図を参照して詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

### 【実施例1】

#### 【0036】

##### スピナーフラスコを用いたVero細胞の細胞培養および細胞継代

サンプル1として、ダルベッコminimum essential medium (DMEM) 培地+5%ウシ胎児血清(FBS)とマイクロキャリアー(アマシャム社製、cytodex1)；サンプル2として、動物由来成分を含有しない無血清培地(インビトロジエン社製、VP-SFM)とマイクロキャリアー(アマシャム社製、cytodex1)；サンプル3として、動物由来成分を含有しない無血清培地(インビトロジエン社製、VP-SFM)とブタ変性コラーゲンが被覆されたマイクロキャリアー(アマシャム社製、cytodex3)；サンプル4として、動物由来成分を含有しない無血清培地(インビトロジエン社製、VP-SFM)と動物由来成分を含有しないプロネクチン(登録商標)を被覆したビーズ状のマイクロキャリアーをそれぞれ準備し、それぞれ別々のスピナーフラスコに入れた。次に、ダルベッコminimum essential medium (DMEM) 培地+5%ウシ胎児血清(FBS)にて継代中のVero細胞を細胞密度 $2 \times 10^5$  cells/mLとなるように上記サンプルの入ったスピナーフラスコにそれぞれ播種した。その後、細胞、培地およびマイクロキャリアーの入った培養液を攪拌し、細胞をマイクロキャリアーに付着させ、細胞を24日間培養した。なお、cytodex1のマイクロキャリアーはこの担体表面に適正な電荷を帯びさせることにより細胞を付着させ、cytodex3のマイクロキャリアーは被覆されたブタ変性コラーゲンにより細胞を付着させ、プロネクチンビーズのマイクロキャリアーはプロネクチンの有するArg Gly Asp配列により細胞を付着させるものである。細胞継代は8日毎に行い、細胞播種3日目より毎日50体積%の培地交換を行った。継代時に用いた動物由来成分を含有しない細胞分散剤(インビトロジエン社製、rProtease(登録商標))を5倍希釀した希釀液にて37°C条件下で細胞分散を行い、遠心操作により上清を除去後、必要量を予め用意されたスピナーフラスコに播種して、継代操作を行った。各サンプルの経時変化における細胞密度を、一般的な血球計数法や顕微鏡観察法などの方法により求め、縦軸に細胞密度(cells/mL)を横軸に時間を表すグラフを図1に示した。

#### 【0037】

図1より、マイクロキャリアーからマイクロキャリアーへの細胞継代を培養開始8日目、16日目にて行ったところ継代時の細胞密度は、動物由来成分を含有しない無血清培地で培養したサンプル2、3及び4ともに細胞密度 $2 \times 10^6$  cells/mLを超える値であった。培養開始24日目では、DMEM培地+5%FBSで培養したサンプル1は細胞密度約 $1.6 \times 10^6$  cells/mL程度であったのに対して、動物由来成分を含有しない無血清培地で培養したサンプル2及び4が同等の細胞密度 $3 \times 10^6$  cells/mLであった。従って、動物由来成分を含有しない培養材料を用いた細胞培養方法においても、従来の動物由来成分を含有する細胞培養方法よりも多くの細胞を培養することができ、且つ外来性物質による汚染の可能性のない細胞を培養できることが判明した。

### 【実施例2】

#### 【0038】

##### スピナーフラスコ培養方法を用いた日本脳炎ウイルス培養

サンプリングは、ウイルス培養2~8日目まで行い、細胞数についてはクエン酸処理後の核酸を測定した。日本脳炎ウイルス(JEV)増殖の指標は(1) HA(赤血球凝集反応、hemagglutination)価については定法に従い測定し、(2) ELISA(酵素抗体法、Enzyme-linked immunosorbent assay)については、抗JEV抗血清をプロテインAカラムによる抗体精製を実施し、ウエスタンブロッティング法により特異反応性を確認後、精製抗体のペル

オキシダーゼ標識を行い、サンドイッチELISAを構築した。なお、ELISA値は参照日本脳炎ワクチン北京株Lot. 197-Pより自家値を付し、不活性精製JEV液を標準抗原として使用した。ELISAによるウイルス産生量の経時変化を表すグラフを図2に示し、HAによるウイルス産生量の経時変化を表すグラフを図3に示した。また、各サンプルにおけるELISA及びHAの測定値の最高値を表1に示した。

【0039】

【表1】

	ウイルス接種時細胞数 ( $\times 10^6$ cells/mL)	HA	ELISA (U/mL)
サンプル1	1.6	256	1949
サンプル2	3	128	1087
サンプル3	2.4	64	626
サンプル4	3	512	2367

【0040】

図2～3及び表1より、DMEM培地+5%FBSとマイクロキャリアー（アマシャム社製、cytodex1）との組合せで細胞培養されたサンプル1は、ウイルス接種直前では、約 $1.6 \times 10^6$  cells/mL程度であったが、ウイルス培養3日目には $2.7 \times 10^6$  cells/mLとなり、動物由来成分を含有しない無血清培地で培養されたサンプル2～4と同等の到着細胞数となった。ELISA値、HA値ともに動物由来成分を含有しない無血清培地と動物由来成分を含有しないプロネクチンビーズとの組合せによるサンプル4で得られた値（ELISA値：2367 U/mL、HA値：512倍）は、DMEM培地+5%FBSとマイクロキャリアー（アマシャム・ファルマシア社製、cytodex1）との組合せで細胞培養されたサンプル1で得られた値（ELISA値：1949 U/mL、HA値：256倍）より高い値を示した。また、本実施例において、到達細胞数およびウイルス産生量ともに動物由来成分を含有しないサンプル4が最も高い値を示した。従って、従来の動物由来成分を含有する細胞培養によるウイルスの生産方法よりも多くのウイルスを培養することができ、且つ外来性物質による汚染の可能性のないウイルスを培養できることが判明した。

【図面の簡単な説明】

【0041】

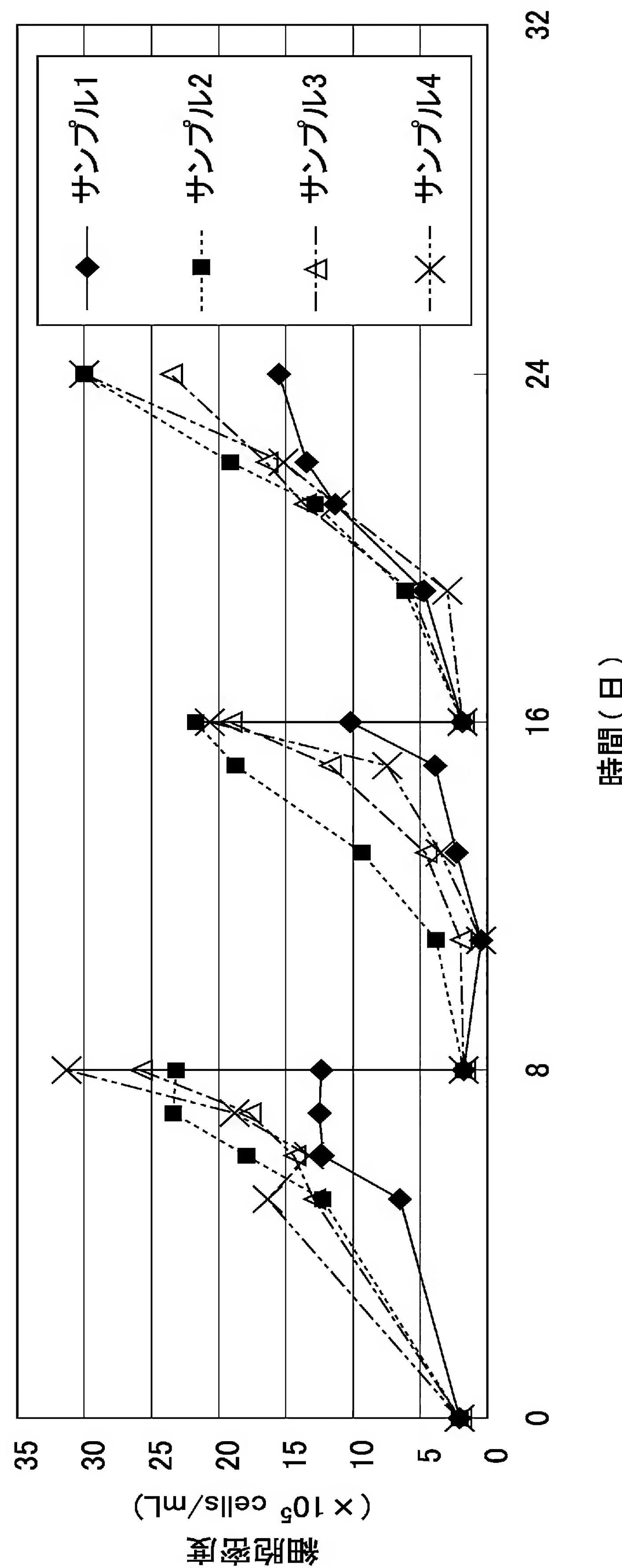
【図1】本発明の実施例1における細胞密度の経時的変化を示すグラフである。

【図2】本発明の実施例2におけるELISAによるウイルス産生量の経時的変化を示すグラフである。

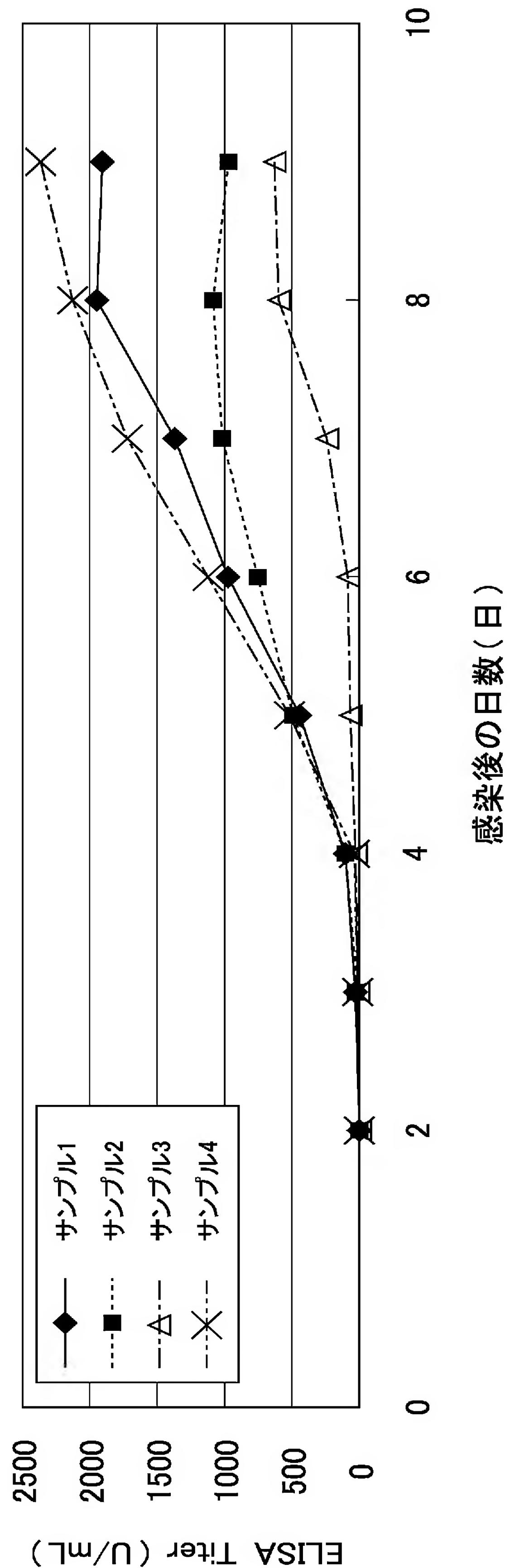
【図3】本発明の実施例2におけるHAによるウイルス産生量の経時的変化を示すグラフである。

【書類名】 図面

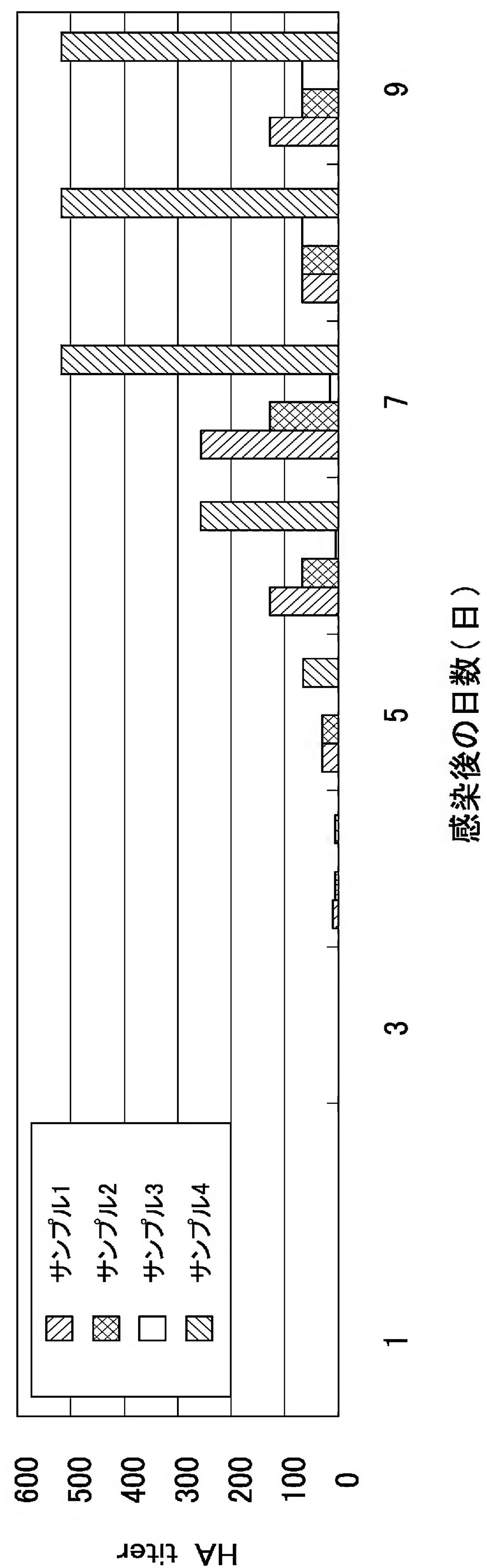
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】接着性細胞の培養とその細胞培養によるウイルスの工業的生産までの全工程において、動物由来成分を全く含有しない培養系での安全で且つ大量に培養可能な接着性細胞の培養方法およびウイルスの生産方法を提供する。

【解決手段】動物由来成分を含有しない培養材料（接着性細胞を接着させるための支持体、細胞の培養に用いる培地、継代培養に用いる細胞分散剤など）を用いることによって、安全で且つ品質が一定した接着性細胞が大量に培養できる。さらに、外来性物質による汚染の可能性を最低限に抑えることができ、未知の感染性因子を含有していることがないので、感染因子を不活化させる処理を行う必要がないなどの利点を有する。

【選択図】なし

出願人履歴

5 9 1 1 2 5 3 7 1

19970612

住所変更

東京都中央区日本橋茅場町三丁目4番2号

デンカ生研株式会社

0 0 0 0 0 2 2 8 8

19900808

新規登録

京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1

三洋化成工業株式会社